

Title	核蛋白質を用いた異所性蛋白質の動物細胞核内への導入
Author(s)	須川, 秀夫
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35008
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	す 須	がわ 川	ひで 秀	お 夫
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6921	号	
学位授与の日付	昭和60年5月8日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	核蛋白質を用いた異所性蛋白質の動物細胞核内への導入			
論文審査委員	(主査)			
	教授	内田	驍	
	(副査)			
	教授	岡田	善雄	教授 松原 謙一

論文内容の要旨

(目的)

真核細胞の持つ最大の特徴の1つである核はその内容を細胞質と極めて異にし、それは核膜が高分子物質の通過に際して高度の選択性を有することに負っている。そこで第一にアフリカツメガエルの核蛋白質(ヌクレオプラスミン; NP)を赤血球ゴースト法を用いて動物細胞へ導入し核内への特異的蓄積について調べ、核膜と核蛋白質の種属特異性について調べた。次いで、異所性蛋白質で核への移行能のない免疫グロブリンと核蛋白質を化学的に結合させてから細胞内へ導入し、その動態について観察し、核膜の有する高分子物質の通過特異性について検討した。

(方法)

1. NPの動物培養細胞内への導入

NPはアフリカツメガエルの卵母細胞からDingwallらの方法(Cell, 1982, 30, p449)によって精製し、Bolton-Hunter試薬を用いて¹²⁵I標識した。これをヒト赤血球と混合し低張液中に透析してゴーストを作成し、HVJ(センダイウィルス)を用いてFL細胞(ヒト), Ehrlich細胞(マウス)へ導入した。各培養時間後細胞を集め、核および細胞質の放射能活性を測定した。また一方で細胞を固定してepon樹脂に包埋し、1-2 μmの厚さにスライスした切片に対してオートラジオグラフィーを施行した。

2. 免疫グロブリン-NP結合体の細胞内導入

細胞核に対する異所性蛋白質としてIgG(マウスモノクローナル抗核蛋白質抗体(NC-18, 無免疫ウサギ抗体)を用いた。これらのIgGを¹²⁵Iで標識しSPDP試薬を用いて人工的SH基を導入したのちSMPB試薬で無標識NPと化学的に結合させた。ゲル濾過法で精製された¹²⁵I-IgG-NP結合体を同様の方法で赤

血球ゴースト内に取り込ませ細胞へ導入しその動態を調べた。

(成 績)

1. NPの動物培養細胞内への導入

^{125}I で標識されたNPをFL細胞, Ehrlich細胞へ導入した時, 30分後にいずれの細胞でも30%以上の放射能活性が核分画に回収されその後も長時間にわたり安定に細胞核内に存続し続けた(半減期約48時間)。一方, ^{125}I -NPを導入した細胞の薄切片を用いたオートラジオグラフィでもNPの核内集積が示され, grain数の測定から細胞内の放射能活性の65%が核内に認められた。

2. 免疫グロブリン-NP結合体の細胞内導入

^{125}I 標識のIgG(分子量16万)を単独で細胞に注入した時, 27時間後でもその90%以上が細胞質に局限していた。一方, ^{125}I -IgGと無標識NPとの化学的結合体(分子量約30万)を赤血球ゴースト法を用いて細胞に導入した時はNP単独時と同様に迅速に放射能活性の核内蓄積が認められ(全放射能活性の60%), 長時間にわたり細胞内に安定に存在した。薄切片のオートラジオグラフィ像からも ^{125}I -IgG-NP結合体の核内蓄積が裏付けられた。これらの結合体や各IgGと細胞homogenateを混合し45分間反応させても, 4%以下が核分画に回収されるにすぎなくこの結合体が非特異的に核と反応したことが否定された。また分離精製された核に対しヘパリンを用いてその核膜を破壊した時は, 無免疫抗体を用いたNP結合体の80%以上が可溶性分画に回収されたが, NC-18抗核抗体との結合体では70%が染色質分画に回収され, NPと結合した抗体が核内に運ばれた後, その抗原と核内で結合したことが示された。

更にIgG-NP結合体の蓄積した核を回収してSDS-PAGEで分析した結果, この結合体は細胞導入前とはほぼ一致したパターンを示し, ほぼ完全な形の結合体が核内に移行し存在していたことが示された。

(総 括)

1. 両棲類核蛋白質NPは動物培養細胞の核内へ特異的に移行し, NPと核膜間の適合性に種特異性の無いことが示された。
2. IgGは単独では核内に侵入しないがNPと結合させることにより核内に蓄積した。これは高分子物質の核膜通過機構は単なる拡散だけではなく特別な選択的通過機構が存在することを示す。

論文の審査結果の要旨

核膜の高分子物質通過機構について, その重要性は古くから言われてきたにもかかわらず, 今日に至るまでその詳細は未知のままである。また, これまでの解析手法は, すべて顕微鏡を用いた形態学的手法によって行なわれてきたが, 本論文では, 細胞工学的的手法, 生化学的手法を用いて解析を行ない, 核膜の通過機構について異種間での適合性及び, 選択的通過機構の存在を証明している。

以上の結果は, 核膜の高分子物質通過機構を解明するうえで, 重要な知見であり, 学位請求に値する優れた研究と認める。